

# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



JC135 U.S. Pro  
09/099307  
06/18/98

## Bescheinigung

Die Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH in Frankfurt am Main/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Neue Insulinderivate mit schnellem Wirkungseintritt"

am 20. Juni 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die Symbole C 07 K, A 61 K und C 12 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 11. Mai 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts  
im Auftrag

Zeichen: 197 26 167.1

Grüne

Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH      HMR 97/L 2009      Dr. MS/we

#### Beschreibung

#### Neue Insulinderivate mit schnellem Wirkungseintritt

Die vorliegende Erfindung betrifft Insulin derivate, welche einen im Vergleich zu Humaninsulin beschleunigten Wirkungseintritt aufweisen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung insbesondere in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Diabetes mellitus.

Weltweit leiden etwa 120 Mio. Menschen an Diabetes mellitus. Darunter sind etwa 12 Mio. Typ I-Diabetiker, für die die Applikation von Insulin die einzige derzeit mögliche Therapie darstellt. Die Betroffenen sind lebenslang, in der Regel mehrmals täglich, auf Insulingaben angewiesen. Obgleich Typ II-Diabetes, an dem etwa 100 Mio. Menschen leiden, nicht grundsätzlich mit einem Mangel an Insulin einhergeht, wird doch in einer Vielzahl von Fällen die Behandlung mit Insulin als günstigste oder einzige mögliche Therapieform angesehen.

Mit fortschreitender Dauer der Krankheit leidet eine große Zahl der Patienten an sogenannten diabetischen Spätkomplikationen. Es handelt sich dabei im wesentlichen um mikro- und makrovaskuläre Schädigungen, die je nach Art und Umfang Nierenversagen, Erblindung, Verlust von Extremitäten oder ein erhöhtes Risiko für Herz/Kreislauferkrankungen zur Folge haben.

Als Ursache werden in erster Linie chronisch erhöhte Blutglucosespiegel verantwortlich gemacht, da auch bei sorgfältiger Einstellung der Insulintherapie ein normales Blutglucoseprofil, wie es der physiologischen Regulation entsprechen würde, nicht erreicht wird (Ward, J. D. (1989) British Medical Bulletin **45**, 111-126; Drury, P.L. et al. (1989) British Medical Bulletin **45**, 127-147; Kohner, E.M. (1989) British Medical Bulletin **45**, 148-173)

- Beim **n** ist die Insulinsekretion eng an die Glucosekonzentration des Blutes gekoppelt. Erhöhte Glucosespiegel, wie sie nach den Mahlzeiten auftreten, werden durch eine gesteigerte Insulinfreisetzung rasch kompensiert. Im nüchternen Zustand sinkt der Plasmainsulinspiegel auf einen basalen Wert ab, der ausreicht, eine kontinuierliche Versorgung insulinempfindlicher Organe und Gewebe mit Glucose zu gewährleisten. Eine Optimierung der Therapie, die sogenannte intensivierte Insulintherapie, zielt heute primär darauf ab, Schwankungen der Blutglukosekonzentration, speziell Entgleisungen nach oben, möglichst gering zu halten (G. Bolli, G. B. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. **6**, S3-S16; Berger, M. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. **6**, S25-S32). Dies führt zu einer signifikanten Verminderung des Auftretens und des Fortschreitens diabetischer Spätschäden (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group (1993) N. Engl. J. Med. **329**, 977-986).
- 5**      Aus der Physiologie der Insulinsekretion läßt sich ableiten, daß für eine verbesserte, intensivierte Insulintherapie unter Verwendung subcutan applizierter Präparate zwei Insulinzubereitungen mit unterschiedlicher Pharmakodynamik benötigt werden. Zur Kompensation des Blutglucoseanstiegs nach den Mahlzeiten muß das Insulin rasch anströmen und darf nur einige Stunden wirken. Zur basalen Versorgung, insbesondere in der Nacht, sollte ein Präparat zur Verfügung stehen, das lange wirkt, kein ausgeprägtes Maximum aufweist und nur sehr langsam anströmt.
- 10**     Die auf humanen und tierischen Insulinen basierenden Präparate erfüllen die Ansprüche einer intensivierten Insulintherapie jedoch nur begrenzt. Rasch wirksame Insuline (Alt-Insuline) gelangen zu langsam ins Blut und an den Wirkort und weisen eine zu lange Gesamtwirkdauer auf. Die Folge ist, daß die postprandialen Glucosespiegel zu hoch liegen und mehrere Stunden nach der Mahlzeit die Blutglucose zu stark absinkt (Kang, S. et al. (1991) Diabetes Care **14**, 142-148; Home, P.J. et al. (1989) British Medical Bulletin **45**, 92-110; Bolli, G. B. (1989) Diabetes Res. Clin. Pract. **6**, S3-S16). Die verfügbaren Basalinsuline wiederum,
- 15**     20      25      30

oralem NPH-Insuline, weissen eine zu kurze Wirkdauer auf und besitzen ein stark ausgeprägtes Maximum.

Leben der Möglichkeit, das Wirkprofil über galenische Prinzipien zu beeinflussen, setzt sich mit Hilfe der Gentechnik heute die Alternative, Insulinderivate zu entwerfen, die bestimmte Eigenschaften wie Wirkungseintritt und -dauer allein durch ihre strukturellen Eigenschaften erzielen. Durch die Verwendung geeigneter Insulinderivate könnte daher eine wesentlich bessere, den natürlichen Verhältnissen finger angeglicheene Einstellung der Blutglucose erreicht werden.

Insulinderivate mit beschleunigtem Wirkungseintritt werden in EP 0 214 826, EP 0 175 437 und EP 0 678 522 beschrieben. EP 0 214 826 bezieht sich u. a. auf Substitutionen von B27 und B28, jedoch nicht in Verbindung mit der Substitution von 33. EP 0 678 522 beschreibt Insulinderivate die in der Position B29 verschiedene Aminosäuren, vorzugsweise Prolin, aufweisen, jedoch nicht Glutaminsäure. EP 0 175 437 umfasst Insulinderivate mit Lysin oder Arginin in B28, die optional zusätzlich n B3 und/oder A21 modifiziert sein können.

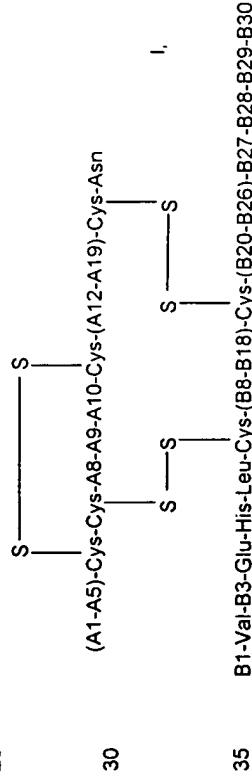
In der EP 0 419 504 werden Insulinderivate offenbart, die gegen chemische Modifikationen geschützt sind, indem Asparagin in B3 und wenigstens eine weitere Aminosäure in den Positionen A5, A15, A18 oder A21 verändert sind. Die hier beschriebenen Insulinderivate weisen jedoch nur eine Modifikation in der Position 33 und keine weitere aus der erwähnten Gruppe auf. Ein Hinweis, daß diese Verbindungen eine veränderte Pharmakodynamik mit der Folge eines schnelleren Wirkungseintritts besitzen, ist nicht gegeben.

In der WO 92/00321 werden Insulinderivate beschrieben, bei denen wenigstens eine Aminosäure der Positionen B1-B6 durch Lysin oder Arginin ersetzt ist. Derartige Insuline weisen gemäß WO 92/00321 eine verlängerte Wirkung auf. Combinationen mit Modifikationen der Positionen B27, 28, 29 werden jedoch nicht offenbart.

Aufgabe! Liegenden Erfindung ist es, Insulinderivate bereitzustellen, die nach Applikation „insbesondere nach subcutaner Application, einen im Vergleich zu Humaninsulin beschleunigten Wirkungseintritt aufweisen.“

- Leben der Möglichkeit, das Wirkprofil über galenische Prinzipien zu beeinflussen, setzt sich mit Hilfe der Gentechnik heute die Alternative, Insulinderivate zu entwerfen, die bestimmte Eigenschaften wie Wirkungseintritt und -dauer allein durch ihre strukturellen Eigenschaften erzielen. Durch die Verwendung geeigneter Insulinderivate könnte daher eine wesentlich bessere, den natürlichen Verhältnissen finger angeglicheene Einstellung der Blutglucose erreicht werden.
- Insulinderivate mit beschleunigtem Wirkungseintritt werden in EP 0 214 826, EP 0 175 437 und EP 0 678 522 beschrieben. EP 0 214 826 bezieht sich u. a. auf Substitutionen von B27 und B28, jedoch nicht in Verbindung mit der Substitution von 33. EP 0 678 522 beschreibt Insulinderivate die in der Position B29 verschiedene Aminosäuren, vorzugsweise Prolin, aufweisen, jedoch nicht Glutaminsäure. EP 0 175 437 umfasst Insulinderivate mit Lysin oder Arginin in B28, die optional zusätzlich n B3 und/oder A21 modifiziert sein können.

- In der EP 0 419 504 werden Insulinderivate offenbart, die gegen chemische Modifikationen geschützt sind, indem Asparagin in B3 und wenigstens eine weitere Aminosäure in den Positionen A5, A15, A18 oder A21 verändert sind. Die hier beschriebenen Insulinderivate weisen jedoch nur eine Modifikation in der Position 33 und keine weitere aus der erwähnten Gruppe auf. Ein Hinweis, daß diese Verbindungen eine veränderte Pharmakodynamik mit der Folge eines schnelleren Wirkungseintritts besitzen, ist nicht gegeben.
- In der WO 92/00321 werden Insulinderivate beschrieben, bei denen wenigstens eine Aminosäure der Positionen B1-B6 durch Lysin oder Arginin ersetzt ist. Derartige Insuline weisen gemäß WO 92/00321 eine verlängerte Wirkung auf. Combinationen mit Modifikationen der Positionen B27, 28, 29 werden jedoch nicht offenbart.



<p><b>5</b></p> <p><b>5.1-A5)</b> die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1) oder tierischem Insulin,</p> <p><b>5.12-A19)</b> die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1) oder tierischem Insulin,</p> <p><b>5.8-B18)</b> die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin,</p> <p><b>5.20-B26)</b> die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin,</p> <p><b>5.3, A9, A10</b> die Aminosäurereste in den Positionen A8, A9 und A10 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1) oder tierischem Insulin,</p> <p><b>5.10</b> der Aminosäurerest in Position B30 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin,</p> <p><b>5.11</b> ein Phenylalaninrest (Phe) oder ein Wasserstoffatom,</p> <p><b>5.12</b> ein natürlich auftretender basischer Aminosäurerest,</p> <p><b>5.17, B28</b> die Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) oder tierischem Insulin oder jeweils ein anderer natürlich auftretender Aminosäurerest, wobei wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich vorkommenden Aminosäurerest ausgetauscht ist.</p>	<p>Von der W-Isoleucin (Ile), Serin (Ser), Threonin (Thr), Cystein (Cys), Methionin (Met), Asparagin (Asn), Glutamin (Gln), Phenylalanin (Phe), Tyrosin (Tyr), Tryptophan (Trp) und Prolin (Pro) als neutrale Aminosäuren, die Aminosäuren Arginin (Arg), Lysin (Lys), und Histidin (His) als basische Aminosäuren und die Aminosäuren Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu) als saure Aminosäuren bezeichnet.</p> <p>Vorzugsweise ist das Insulinderivat oder dessen physiologisch verträgliches Salz gemäß der vorliegenden Erfindung ein Derivat von Rinderinsulin, Schweineinsulin oder Humaninsulin, nämlich ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, das sich dadurch auszeichnet, daß</p> <p>A8 Alanin (Ala), A9 Serin (Ser), A10 Valin (Val) und B30 Alanin (Ala) bedeuten (Aminosäurereste A8 bis A10 und B30 des Rinderinsulins),</p> <p>A8 Threonin (Thr), A9 Serin (Ser) und A10 Isoleucin (Ile) bedeuten (Aminosäurereste A8 bis A10 der Insuline von Mensch oder Schwein), wobei B30 Alanin (Ala) (Aminosäurerest B30 von Schweineinsulin) oder B30 Threonin (Thr) bedeutet (Aminosäurerest B30 von Humaninsulin, vgl. SEQ ID NO 2).</p> <p>Besonders bevorzugt ist ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I mit den Aminosäureresten A8 bis A10 und B30 von Humaninsulin, welches sich ferner dadurch auszeichnet, daß</p> <p>(A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1),</p>
--	---

- 2-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 1),
- I-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) und
- :O-B26) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin (vgl. SEQ ID NO 2) bedeuten.
- itere bevorzugte Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung sind ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, durch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette ein Histidin- (His), Lysin- (Lys) oder Argininrest (Arg) ist.
- itere bevorzugte Ausgestaltungen der vorliegenden Erfindung sind ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, durch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden Aminosäurerest ersetzt ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen Aminosäuren,
- I Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, durch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest welcher ausgewählt ist aus der Gruppe Isoleucin (Ile), Asparaginsäure (Asp) und Iutaminsäure (Glu), vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden Aminosäurerest ersetzt ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen Aminosäuren, oder besonders bevorzugt ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der

- Aminosäurerest in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist, oder
- ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der sauren Aminosäuren, vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist, vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 oder B28 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist, oder dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.
- 15 Eine bevorzugte Ausgestaltung der vorliegenden Erfindung ist auch ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B29 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist.
- 20 Weitere bevorzugte Ausgestaltungen sind ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Glutamaminsäurerest (Glu) ist,
- ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist, oder
- ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B29 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.
- 30 Ganz besonders bevorzugt ist ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

- e Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 • Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Glu Thr  
 fweist (SEQU ID NO 3), oder
- i Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich durch auszeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Ileucinrest (Ile) ist, vorzugsweise ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

e Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

r Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Ile Pro Lys Thr

fweist (SEQU ID NO 5), oder

- i Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, durch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der B-Kette ein Ileucinrest (Ile) ist, vorzugsweise ein Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, das sich dadurch auszeichnet, daß die B-Kette die Sequenz

e Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 r Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

fweist (SEQU ID NO 4).

- Insulinderivate der Formel I lassen sich vorzugsweise gentechnologisch herstellen.

- Die eingangs gestellte Aufgabe wird demnach ferner gelöst durch ein Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivats oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben der Formel I, umfassend die Konstruktion eines replizierbaren Expressionsvektorkomplexes, welches eine DNA-Sequenz enthält, die für einen Vorfäufer des Insulinderivats kodiert, in welchem der Aminosäurerest in Position A1 der A-Kette mit dem Aminosäurerest B30 der B-Kette über eine Peptidkette der Formel II

-R<sup>1</sup><sub>n</sub>-Arg-

II

- verknüpft ist, worin R<sup>1</sup><sub>n</sub> eine Peptidkette mit n Aminosäureresten ist und n eine ganze Zahl von 0 bis 34 bedeutet, und die B-Kette an Position B1 mit einer Peptidkette der Formel III

Met-R<sup>2</sup><sub>m</sub>(Arg)<sub>p</sub>-

III

- 15 verlängert ist, worin R<sup>2</sup><sub>m</sub> eine Peptidkette mit m Aminosäureresten ist, m eine ganze Zahl von 0 bis 40, vorzugsweise von 0 bis 9, und p 0, 1 oder 2 bedeutet, wobei für p = 0 vorzugsweise die Peptidkette R<sup>2</sup><sub>m</sub> mit Lys endet, Expression in einer Wirtszelle und Freisetzung des Insulinderivats aus dessen Vorfäufer mit chemischen und/oder enzymatischen Methoden.

- 20 Vorzugsweise ist das Verfahren, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein Bakterium ist, besonders bevorzugt dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium E. coli ist.

- 25 Vorzugsweise ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle eine Hefe ist, besonders bevorzugt dadurch gekennzeichnet, daß die Hefe Saccharomyces cerevisiae ist.

- Zur Herstellung eines Insulinderivats mit der Aminosäuresequenz SEQU ID NO3 weist der Vorfäufer dieses Insulinderivates vorzugsweise die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg  
 Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu

Yr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Glu Th  
 Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly  
 Sily Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gin Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
 Ser Leu Gin Lys Arg  
 Sily Ile Val Glu Gin Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gin  
 .eu Glu Asn Tyr Cys Asn

Iuf (SEQU ID NO 6).

Zur Herstellung eines Insulinnderivats mit der Aminosäuresequenz SEQU ID NO 5 verfeist der Vorläufer dieses Insulinnderivates vorzugsweise die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg  
 The Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 Yr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Ile Pro Lys Thr  
 Vrg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly  
 Sily Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gin Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
 Ser Leu Gin Lys Arg  
 Sily Ile Val Glu Gin Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gin  
 .eu Glu Asn Tyr Cys Asn

Iuf (SEQU ID NO 7).

Die vorliegende Erfindung betrifft demnach auch die genannten Vorläufer der bevorzugten Insulinlderivate, nämlich die Peptide mit den Sequenznummern SEQU ID NO 6, SEQU ID NO 7 und SEQU ID NO 8, die DNA-Sequenzen, welche für die genannten Vorläufer kodieren, die Expressionsvehikel, welche diese DNA-Sequenzen enthalten sowie die Wirtszellen, welche mit diesen Expressionsvehikeln transformiert sind.

15

Die Herstellung der Insulinlderivate der Formel I erfolgt hauptsächlich gentechnologisch mittels site-directed mutagenesis nach Standardmethoden.

Dazu wird eine für das gewünschte Insulinlderivat der Formel I codierende Genstruktur konstruiert und in einer Wirtszelle - vorzugsweise in einem Bakterium wie E. coli oder eine Hefe, insbesondere *Saccharomyces cerevisiae* - zur Expression gebracht und -falls die Genstruktur für ein Fusionsprotein codiert - aus dem Fusionsprotein das Insulin-Derivat der Formel I freigesetzt; analoge Methoden sind z.B. beschrieben in EP-A-0 211 299, EP-A-0 227 938, EP-A-0 229 998, EP-A-0 286 956 und der DE-Patentanmeldung P 38 21 159.

20  
 25  
 Die Abspaltung des Fusionsproteinanteils kann nach Zellenaufschluß chemisch mittels Halogencyan (siehe EP-A-0 180 920) erfolgen.

Zur Herstellung eines Insulinnderivats mit der Aminosäuresequenz SEQU ID NO 4 verfeist der Vorläufer dieses Insulinnderivates vorzugsweise die Sequenz

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg  
 The Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 Yr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Ile Lys Thr

bei der Herstellung mittels eines Präproinsulinvorläufers der einen Fusionsproteinanteil (Präsequenz) nach US 5,358,857 besitzt, erfolgt die Abspaltung des Fusionsproteinanteils auf einer späteren Stufe zusammen mit der Abspaltung des C-Peptides.

Der Insulinvorläufer wird dann der oxidativen Sulfitolyse nach der z.B. von R.C. Marshall und A.S. Inglis in "Practical Protein Chemistry - A Handbook" ( Herausgeber A. Dabre ) 1986, Seiten 49 - 53 beschriebenen Methode unterworfen und anschließend in Gegenwart eines Thiools unter Ausbildung der korrekten Disulfidbrücken renaturiert, z.B. nach der von G.H. Dixon und A.C. Wardlow in Nature (1960), Seiten 721 - 724 beschriebenen Methode.

In Insulinvorläufer können jedoch auch direkt gefaltet werden (EP-A-0 600 372; P-A-0 668 292).

Das C-Peptid wird mittels tryptischer Spaltung entfernt - z.B. gemäß der Methode von Kemmler et al., J.B.C. (1971), Seiten 6786 - 6791 und das Insulinderivat der Formel I mittels bekannter Techniken wie Chromatographie - z.B. EP-A-0 305 780 - und Kristallisation gereinigt.

Die Formel II O ist, dient die tryptische Spaltung der Trennung der A-B-Kette, bei diesen Verfahren endet die B-Kette C-terminal mit Arginin oder zwei Arginineresten. Diese können enzymatisch mittels Carboxypeptidase B entfernt werden.

Als erfindungsgemäßen Insulinderivate besitzen volle biologische Aktivität. Dies würde durch intravenöse Applikation an Kaninchen und der daraus resultierenden Blutzuckersenkung gezeigt (Beispiele 5 und 6).

Der schnellere Wirkungseintritt nach subcutaner Applikation wurde mit der euglykämischen Clamp Technik am nüchternen Hund gezeigt (Beispiel 7). Es wurden 0,3 IE/kg verabreicht. Referenzpräparat war Humaninsulin. Bei der Clamptechnik wird nach der Insulininjektion in kurzen Zeitabständen der Blutzucosewert gemessen und genau soviel Glucose infundiert, um die Absenkung zu kompensieren. Dies hat den Vorteil, daß bei den Tieren keine Gegenregulation auftritt, wie es bei einem starken Abfall der Blutzucose nach der Gabe von Insulin der Fall wäre. Die Menge und der zeitliche Verlauf der infundierten Glucose charakterisieren die Wirkung des Insulins. Lys(B3), Glu(B29)- (SEQ ID NO 3) und Lys(B3), Ile(B28)- (SEQ ID NO 4) Insulin weisen einen deutlich schnelleren Wirkungseintritt als Humaninsulin auf. Die maximale Wirkung (Glucoseinfusionsrate) wird mit Humaninsulin nach 100 Minuten erreicht, mit Lys(B3), Glu(B29)-Insulin (SEQ ID NO 3) dagegen nach 80 Minuten und mit Lys(B3)-, Ile(B28)-Insulin (SEQ ID NO 4) bereits nach 60 Minuten. Daher sollten diese Analoga, wenn sie kurz vor einer Mahlzeit injiziert werden, den postprandialen Anstieg der Blutzucose besser kompensieren als Humaninsulin.

Die beschriebenen Insulinderivate eignen sich sowohl zur Therapie des Typ I- als auch des Typ II-Diabetes mellitus vorzugsweise in Verbindung mit einem Basalinsulin.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die Verwendung des Insulinderivats und/oder dessen physiologisch verträglichen Salzes der Formel I zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinkaktivität mit schnellem Wirkungseintritt aufweist.

Als physiologisch unbedenkliches und mit dem Insulinderivat verträgliches Trägermedium eignet sich eine sterile wässrige Lösung, die zu Blut in der üblichen Weise, z.B. durch Glycerin, Kochsalz, Glucose, isotonisch gemacht wird und daneben noch eines der gebräuchlichen Konservierungsmittel z.B. Phenol, m-Kresol

Einstellung des pH werden verdünnte Säuren (typischerweise HCl) bzw. Laugen (typischerweise NaOH) verwendet. Die Zubereitung kann ferner Zinkionen enthalten.

Die Insulin-Derivate können in den pharmazeutischen Zubereitungen auch in Form lösener physiologisch verträglichen Salze, als Alkali- oder Ammoniumsalze, eingesetzt werden. Ein beliebiger Anteil eines oder mehrerer Insulin-Derivate der Formel I oder ein Insulin-Derivat der Formel I kann in einer Mischung weiterer lösiger Insulin-Derivate unabhängig voneinander jeweils in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form vorliegen.

Es ist manchmal vorteilhaft, der erfindungsgemäßigen Zubereitung eine geeignete Länge eines geeigneten Stabilisators zuzusetzen, der die Präzipitation von Protein bei thermisch-mechanischer Belastung bei Kontakt mit verschiedenen Materialien verhindert. Solche Stabilisatoren sind beispielsweise aus der EP-A-18609 der WO-A-32 40 177 oder aus der WO-83/00288 bekannt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine pharmazeutische Zubereitung, die durch gekennzeichnet ist, daß sie mindestens ein Insulinderivat und/oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben der Formel I, vorzugsweise in gelöster, amorpher und/oder kristalliner Form, enthält.

Die erfindungsgemäßigen Insulinderivate sind durch einen schnellen Wirkungsseintritt gekennzeichnet. In der praktischen Insulintherapie ist es unter Umständen üblich, schnell wirkende Insuline mit Zubereitungen zu mischen, die einen Depothilfsstoff enthalten (z.B. NPH-Insulin). Daraus resultieren je nach Zusammensetzung überlagerungen, deren Wirkprofile den überlagerten Einzelprofilen entsprechen, offen die Einzelkomponenten in der Mischung stabil sind und sich gegenseitig nicht beeinflussen. Bei der Mischung eines Insulinderivates mit humanem NPH-Insulin ist jedoch zu erwarten, daß besonders bei längerfristiger Lagerung ein Austausch zwischen dem gelösten Derivat und dem kristallinen NPH-Insulin

stattfindet. Dadurch wird sowohl die Pharmakodynamik des Depotinsulins wie auch die des gelösten schnell wirksamen Insulins in unvorhersehbarer Weise verändert. Um dies zu vermeiden, ist es sinnvoll, das schnell wirksame Derivat unter Verwendung eines Depothilfsstoffs - beispielsweise als NPH-Insulin - 5 zuzubereiten. Diese Depotform des Insulinderivates kann dann beliebig mit der gelösten schnell wirksamen Form gemischt werden, ohne daß sich die Zusammensetzung der einen oder anderen Form im Verlauf der Lagerung durch Austausch verändert.

10 Obwohl die Erfindung im Kern schnell wirkende Insulinderivate betrifft, umfaßt sie dennoch doch auch die Möglichkeit, derartige Derivate zum Zweck der Mischarkeit als Depotform zuzubereiten, wobei vorzugsweise der Depothilfsstoff Protaminsulfat ist und das Insulinderivat und/oder dessen physiologisch verträgliche Salz mit dem Protaminsulfat in einem Cokristallisat vorliegt.

15

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner eine injizierbare Lösung, welche die vorstehend beschriebenen pharmazeutischen Zubereitungen in gelöster Form enthält.

20 Beispiele

Beispiel 1: Konstruktion von Lys (B3)-Proinsulin als Ausgang für die erfindungsrelevanten Plasmide entsprechend den Beispielen 2-4

25 In der US 5,358,857 sind der Vektor pINT 90d und die PCR Primer Tir und Insu 11 beschrieben. Diese Komponenten dienen als Ausgangsmaterial für die Konstruktion eines Plasmids pINT 125d, das für das gewünschte Lys (B3)-Proinsulin kodiert.

Isätzlich werden die Primer Insu 35 mit der Sequenz

5' TTT GTG AAG CAG CAC CTG 3'

id Insu 36 mit der Sequenz

5' CAG GTG CTG CTT CAC AAA 3'

ntheisiert.

Die PCR-Reaktion wird mit den Primern Tir und Insu 36 und eine zweite Reaktion mit den Primern Insu 11 und Insu 35 durchgeführt. Als Template dient zu pINT 90d DNA.

Produkte der beiden PCR Reaktionen sind partiell komplementär, so daß sie, in sie in einer dritten PCR-Reaktion mit den Primern Tir und Insu 11 vereinigt werden, ein Fragment ergeben, das für eine Proinsulinvariante kodiert, die an position 3 der B-Kette Lysin enthält. Dieses PCR-Fragment wird zur Reinigung in ethanol gefällt, getrocknet und anschließend gemäß den Angaben der Hersteller mit den Restriktionsenzymen Nco 1 und Sal 1 verdaut. Das Reaktionsgemisch wird gelektrophoretisch aufgetrennt und das gewünschte Nco 1 / Sal 1 - Fragment isoliert.

Der zitierten Anmeldung ist ein Plasmid pINT 91d beschrieben, das für ein ni-Proinsulin codiert. Spaltet man die für Mini-Proinsulin kodierende Sequenz teils Nco 1 und Sal 1 heraus und isoliert die Restplasmid-DNA, so kann man die Restplasmid-DNA mit dem dargestellten Nco 1/Sal 1 - PCR-Fragment in der T 4-Ligasereaktion zu dem Plasmid pINT 125d umsetzen. Dieses wird nach Zoli K12 transformiert, dort vermehrt und reisoliert. Nach Verifikation der Ismidstruktur mittels DNA-Sequenz- und Restriktionsanalyse dient pINT 125d-

DNA als Template-DNA zur Einführung weiterer Mutationen in diese Proinsulinvariante.

Beispiel 2: Konstruktion von Lys (B3) Glu (B29)-Proinsulin

- 5 Zur Herstellung des Mureins werden die Primer 329 a mit der Sequenz  
5' TTC TAC ACA CCC GAG ACC CGC GGC ATC G - 3'
- 10 und 329b mit der Sequenz  
5' GCC GCG GGT CTC GGG TGT GTA GAA GAA GC 3'
- 15 synthetisiert.
- 20 Als Template wird DNA der Plasmide pINT125d und pINT91d verwendet. Primer 329a wird mit Primer Insu 11 auf dem Template pINT91d und Primer 329b mit Tir (siehe obiges Beispiel) auf dem Template pINT125d in einer PCR-Reaktion umgesetzt. Da beide PCR-Produkte partiell komplementär sind, können sie in einer direkten PCR-Reaktion vereinigt und mit den Primern Tir und Insu 11 erneut umgesetzt werden. Es entsteht ein DNA-Fragment, das für das gewünschte Mutein kodiert. Dieses Fragment wird mit den Restriktionsenzymen Nco 1 und Sal 1 doppelverdaut und das entstandene Nco 1/Sal 1 Fragment in die pINT 91d Restplasmid-DNA in einer T4-Ligasereaktion inseriert.
- 25 Es entsteht das Plasmid pINT 329, das nach Amplifikation in E. coli K12 mittels Restriktions- und DNA-Sequenzanalyse in Bezug auf die gewünschte Struktur verifiziert wird.

s von dem Plasmid kodierte Proinsulin-Derivat ist durch die beiden Aminosäureaustausche und ein C-Verbindungsgrlied, das aus der Aminosäure Ginin besteht, charakterisiert.

**Beispiel 3:** Konstruktion von Lys (B3) Ile (B28)-Proinsulin

Konstruktion erfolgt gemäß Beispiel 3 mit den Primerpaaren:

**KB3 JB 27A**

5' TTC TAC ATC CCC AAG ACC CGC CG 3'

und Insu 11

wie

**K B3 J 27B**

5' CTT GGG GAT GTA GAA GAA GCC TCG 3'

und Tir.

Template dient in beiden PCR - Reaktionen DNA des Plasmides pINT125d. PCR - Produkte beider Reaktionen werden in einer dritten Reaktion, wie in Beispiel 1 beschrieben, vereinigt und das Produkt entsprechend dem Beispiel niert.

entsteht das Plasmid pINT32.

**Beispiel 4:** Konstruktion von Lys (B3) Ile (B28)-Proinsulin

Die Konstruktion erfolgt gemäß Beispiel 3 mit den Primerpaaren:

**KB3 JB 28A**

5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'  
und Insu 11

Konstruktion erfolgt gemäß vorhergehendem Beispiel mit den Primerpaaren:

**KB J B28B**

5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'

und Tir.

Es entsteht das Plasmid pINT 333.

**Expression der konstruierten Insulinvarianten**

- 5 KB3 JB 28A  
5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'  
und Insu 11
  - 10 KB J B28B  
5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'
  - 15 und Tir.
- Es entsteht das Plasmid pINT 333.

**Expression der konstruierten Insulinvarianten**

- 5 KB3 JB 28A  
5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'  
und Insu 11
  - 10 KB J B28B  
5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'
  - 15 und Tir.
- Es entsteht das Plasmid pINT 333.

Die Konstruktion erfolgt gemäß Beispiel 3 mit den Primerpaaren:

**KB3 JB 28A**

5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'  
und Insu 11

Konstruktion erfolgt gemäß vorhergehendem Beispiel mit den Primerpaaren:

**KB J B28B**

5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'

und Tir.

Es entsteht das Plasmid pINT 333.

**Expression der konstruierten Insulinvarianten**

- 5 KB3 JB 28A  
5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'  
und Insu 11
  - 10 KB J B28B  
5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'
  - 15 und Tir.
- Es entsteht das Plasmid pINT 333.

- 5 KB3 JB 28A  
5' TAC ACA ATC AAG ACC CGC CGG GAG - 3'  
und Insu 11
  - 10 KB J B28B  
5' GGT CTT GAT TGT GTA GAA GAA GCC TCG - 3'
  - 15 und Tir.
- Es entsteht das Plasmid pINT 333.

**Beispiel 5:** Biologische Aktivität von Lys(B3), Glu(B29)-Insulin nach intravenöser Gabe an Kaninchen

Zeit [h]	Human-Insulin	Lys(B3), Glu(B29)-Insulin
0	100	100
0.25	89.17	89.47
0.5	67.56	58.32
0.75	73.24	66.59
1	73.13	68.21
1.5	78.12	71.95
2	89.47	80.88
3	107.01	94.2
4	104.55	99.78

3 Kaninchen erhielten intravenös die angegebenen Insuline (0,2 IE/kg). Im Verlauf der folgenden vier Stunden wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Blutglukosekonzentration bestimmt und auf % des Ausgangswertes zur Zeit 0 berechnet. Die Mittelwerte zeigen keine signifikanten Unterschiede der biologischen Aktivität zwischen Humaninsulin und Lys(B3), Glu(B29)-Insulin.

**Beispiel 6:** Biologische Aktivität von Lys(B3), Ile(B27)- und Lys(B3), Ile(B28)-Insulin nach intravenöser Gabe an Kaninchen

3 Kaninchen erhielten intravenös die angegebenen Insuline (0,2 IE/kg). Im Verlauf der folgenden vier Stunden wurde zu den angegebenen Zeitpunkten die Blutglukosekonzentration bestimmt und auf % des Ausgangswertes zur Zeit 0 berechnet. Die Mittelwerte zeigen keine signifikanten Unterschiede der biologischen Aktivität zwischen Humaninsulin, Lys(B3), Ile(B27)- und Lys(B3), Ile(B28)-Insulin.

Zeit [h]	H-Insulin	Lys(B3), Ile(B27)-Insulin	Lys(B3), Ile(B28)-Insulin
0	100	100	100
0,33	67.8	62.6	63.3
0,66	54.9	60.6	55.8
1	55.2	66.8	59.3
1,5	63	79.2	66.7
2	77.8	90.9	81.6
3	91.5	96.3	97.2
4	99.5	96	101.6

**Beispiel 7:** Pharmakodynamik von Lys(B3), Glu(B29)-Insulin und Lys(B3), Ile(B28)-Insulin nach subcutaner Applikation am Hund

5 Jeweils vier Hunde erhielten subcutane Injektionen der angegebenen Insuline (0,3 IE/kg). Die Blutglucose wurde durch kontinuierliche Infusion von Glucose bei 3,7 bis 4 mmol/l gehalten. Gezeigt ist die mittlere Glucoseinfusions-Rate ± SEM vom Zeitpunkt der Injektion ( $t = 0$ ) über 240 Minuten.

10

**GLUCOSE-CLAMP BEIM NÜCHTERNEN HUND MIT SCHNELL WIRKSAMEN INSULINDERIVATEN**

Kenngrößen der Glucoseinfusions-Profile

Dosis: 1 x 0.3 IU/kg s.c. bei  $t_0$       (n = 4)

Präparat	Inkrement-Phase		$t_{max}$ (min)	Dekrement-Phase	
	Wendepunkt (min)	Slope des Wendepunkts		Wendepunkt (min)	Slope des Wendepunkts
H-Insulin Hoechst	43	0.144	100	156	- 0.065
Lys(B3),Glu(B29)-Insulin	33	0.227	80	127	- 0.091
Lys(B3),Ile(B28)-Insulin	16	0.267	60	104	- 0.102

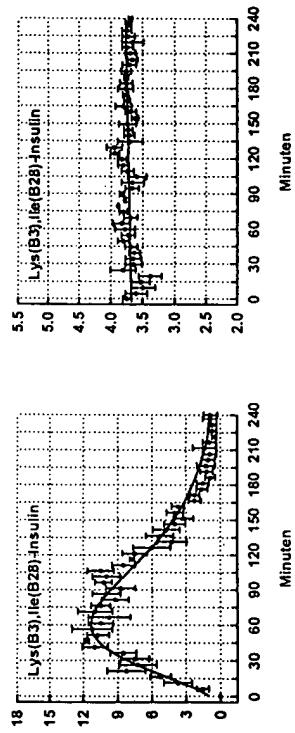
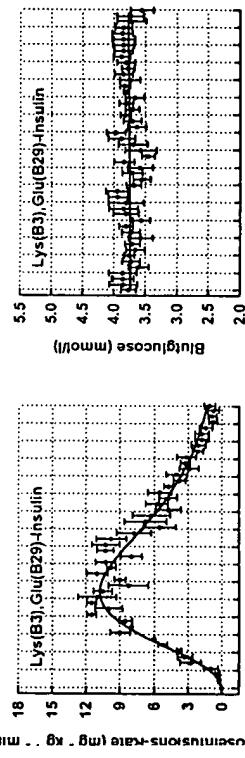
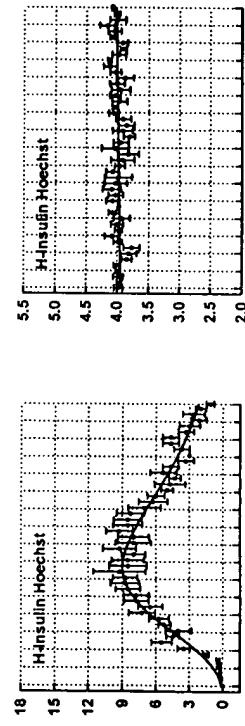
**GLUCOSE-CLAMP BEIM NÜCHTERNEN HUND MIT SCHNELL WIRKSAMEN INSULINDERIVATEN**

Dosis: 1 x 0.3 IU/kg s.c. bei  $t_0$       (mean  $\pm$  sem, n = 4)

Zeit min	H-Insulin Hoechst		Blutglucose		Lys(B3),Glu(B29)-Insulin		Blutglucose		Lys(B3),Ile(B28)-Insulin		Blutglucose			
	Glucoseinfusions-Rate mg $\cdot$ min $^{-1}$ $\cdot$ kg $^{-1}$ mean	sem	Zeit min	mean	sem	Zeit min	mean	sem	Zeit min	mean	sem	Zeit min	mean	sem
0	0.00	0.00	0	3.98	0.07	0	0.00	0.00	0	3.77	0.12	0	0.00	0.00
6	0.14	0.01	4	3.97	0.04	6	0.24	0.08	5	3.85	0.22	6	1.54	0.53
11	0.23	0.08	9	3.88	0.08	11	0.36	0.18	10	3.86	0.17	11	3.75	1.24
16	0.35	0.19	14	3.59	0.04	16	0.95	0.60	15	3.86	0.22	16	5.25	0.89
21	0.44	0.18	19	4.01	0.05	21	2.75	0.96	20	3.81	0.16	21	8.25	1.87
26	1.50	0.25	24	3.85	0.08	26	3.25	0.65	25	3.73	0.14	26	7.25	1.63
31	3.50	0.56	29	3.82	0.13	31	3.75	0.22	30	3.76	0.08	31	7.50	1.25
36	5.50	0.90	34	3.77	0.13	36	5.25	0.41	35	3.66	0.15	36	8.50	1.15
41	4.50	0.48	39	3.99	0.07	41	6.00	0.00	40	3.71	0.12	41	11.00	1.12
46	4.00	1.17	44	4.09	0.11	46	9.00	0.87	45	3.58	0.19	46	11.75	0.22
51	5.25	0.54	49	3.98	0.06	51	8.00	0.00	50	3.73	0.14	51	10.75	0.96
56	5.75	0.89	54	4.01	0.10	56	6.50	0.56	55	3.81	0.11	56	11.25	1.78
61	1.25	1.19	59	3.93	0.13	61	11.50	0.43	60	3.57	0.14	61	10.50	1.09
66	6.50	1.09	64	4.08	0.06	67	10.00	1.22	65	3.81	0.20	66	9.75	1.85
71	7.75	1.08	69	3.98	0.01	71	11.50	0.43	70	3.85	0.23	71	11.00	1.50
76	7.75	1.14	74	4.08	0.10	76	11.00	1.70	75	3.81	0.28	76	10.50	0.83
81	6.50	1.09	79	4.03	0.12	81	10.50	0.83	80	3.94	0.15	81	9.25	1.19
86	6.75	1.29	84	4.09	0.15	86	8.25	1.75	85	3.95	0.18	86	10.00	1.22
91	8.75	1.08	89	4.03	0.18	91	9.00	0.50	90	3.69	0.12	91	8.75	1.29
96	9.25	2.33	94	3.99	0.22	96	11.00	0.94	95	3.56	0.14	96	10.25	0.74
101	6.50	1.68	99	4.08	0.10	101	9.75	0.41	100	3.71	0.16	101	10.00	1.22
106	8.50	1.44	104	3.96	0.08	106	10.25	0.89	105	3.59	0.20	106	10.50	1.15
111	6.00	1.06	109	3.92	0.19	111	8.00	0.94	110	3.84	0.16	111	8.50	1.03
116	9.25	1.47	114	3.83	0.17	116	10.25	0.74	115	3.46	0.10	116	7.75	0.22
121	6.00	1.58	119	4.04	0.21	121	10.25	1.24	120	3.58	0.25	121	7.50	1.21
126	8.00	1.37	124	3.95	0.12	126	9.75	1.34	125	3.70	0.23	126	8.00	1.62
131	9.25	1.19	129	3.81	0.09	131	7.75	1.52	130	3.84	0.21	131	4.25	1.29
136	8.50	1.30	134	3.92	0.16	136	5.50	1.44	135	3.97	0.15	136	5.33	1.19
141	8.50	1.25	139	3.86	0.13	141	6.75	1.85	140	3.64	0.15	142	4.75	1.19
146	8.25	1.24	144	3.91	0.12	146	6.25	1.67	145	3.71	0.14	146	4.00	0.94
151	7.00	1.46	149	4.06	0.08	151	4.75	1.14	150	3.82	0.08	151	3.25	0.69
156	6.25	1.29	154	4.05	0.04	156	5.75	0.96	155	3.71	0.11	156	4.00	0.71
161	6.00	0.79	159	3.97	0.12	161	4.75	0.62	160	3.81	0.11	162	3.75	0.54
166	5.00	0.50	164	4.04	0.09	166	5.50	1.03	165	3.67	0.15	166	2.25	0.54
171	4.75	1.39	169	3.95	0.15	171	4.75	0.41	169	3.81	0.04	171	2.25	0.41
176	4.33	0.54	174	4.01	0.12	176	3.75	0.54	175	3.83	0.08	176	1.63	0.48
181	5.33	1.19	179	3.88	0.14	181	4.00	0.94	180	3.75	0.16	181	1.54	0.53
186	4.67	0.72	184	4.03	0.09	186	2.65	0.97	185	3.85	0.14	186	0.88	0.46
191	3.33	0.72	189	4.12	0.11	191	3.25	0.41	190	3.78	0.10	191	1.19	0.54
196	3.00	0.00	194	4.13	0.03	196	3.13	0.54	195	3.81	0.14	196	1.28	0.79
201	3.67	0.72	199	3.98	0.11	201	2.13	0.51	200	3.88	0.13	202	1.07	0.58
206	4.67	0.72	204	3.91	0.05	206	2.06	0.66	205	3.85	0.14	206	0.94	0.60
211	4.67	0.72	209	3.92	0.08	211	1.79	0.62	210	3.85	0.17	212	1.41	1.04
216	3.33	0.72	214	4.09	0.04	216	1.78	0.63	215	3.85	0.18	217	0.95	0.60
221	3.00	0.94	219	4.05	0.11	221	1.41	0.58	220	3.87	0.16	221	0.54	0.21
226	2.17	0.68	224	4.17	0.12	226	0.78	0.26	225	3.85	0.13	226	0.72	0.38
231	2.67	0.98	229	4.00	0.13	231	0.85	0.37	230	3.72	0.23	231	0.69	0.38
236	2.00	0.47	234	4.01	0.05	236	0.76	0.51	235	3.74	0.21	237	0.94	0.60
240	1.17	0.36	239	4.08	0.02	240	1.07	0.47	240	3.56	0.18	240	0.88	0.61

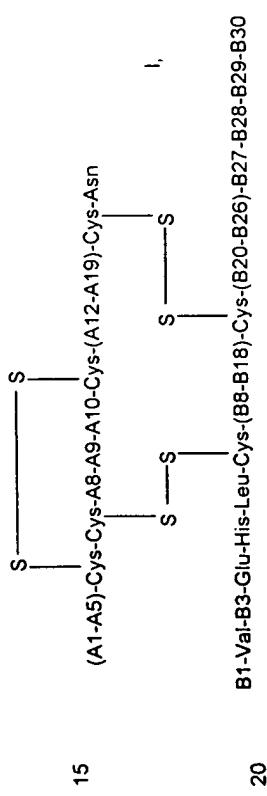
**GLUCOSE-CLAMP BEIM NÜCHTERNEN HUND MIT SCHNELL WIRKAMEN INSULINERIVATEN**

Dosis: 1 x 0.3 IU/kg s.c. bei  $t_0$   
(mean  $\pm$  sem, n = 4)



**Patentanspruch**

1. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben, in welchem Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden basischen Aminosäurerest ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in den Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei fakultativ Phenylalanin (Phe) in Position B1 der B-Kette fehlen kann.
10. 2. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 1, gekennzeichnet durch Formel 1



B1-Val-B3-Glu-His-Leu-Cys-(B8-B18)-Cys-(B20-B26)-B27-B28-B29-B30

- 5 20 25 30 30 30
- 15 (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- 20 (A12-A19) die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- 25 (B8-B18) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,
- 30 (B20-B26) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

· A9, A10 die Aminosäurereste in den Positionen A8, A9 und A10 der A-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

0 der Aminosäurerest in Position B30 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin,

ein Phenylalaninrest (Phe) oder ein Wasserstoffatom,

ein natürlich auftretender basischer Aminosäurerest,

7, B28 die Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette von Humaninsulin oder tierischem Insulin oder jeweils ein anderer natürlich auftretender Aminosäurerest, wobei wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27 B28 und B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist.

Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß

Alanin (Ala),

Serin (Ser),

Valin (Val) und

Alanin (Ala) bedeuten.

Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß

Threonin (Thr),

Serin (Ser) und

Isoleucin (Ile) bedeuten.

5. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß B30 Alanin (Ala) bedeutet.
6. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß B30 Threonin (Thr) bedeutet.
7. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäurereste in den Positionen A1 bis A5 der A-Kette von Humaninsulin,
- 10 (A1-A5) die Aminosäurereste in den Positionen A12 bis A19 der A-Kette von Humaninsulin,
- 15 (A12-A19) die Aminosäurereste in den Positionen B8 bis B18 der B-Kette von Humaninsulin und
- 20 (B20-B26) die Aminosäurereste in den Positionen B20 bis B26 der B-Kette von Humaninsulin bedeuten.
8. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B1 der B-Kette ein Phenylalaninrest (Phe) ist.
- 25 9. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette ein Histidin- (His), Lysin- (Lys) oder Argininrest (Arg) ist.
- 30 10. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette ein Histidinrest (His) ist.

11. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette ein Argininrest (Arg) ist.
12. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B3 der B-Kette ein Lysinrest (Lys) ist.
13. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen Aminosäuren.
14. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe Isoleucin (Ile), Asparaginsäure (Asp) und Glutaminsäure (Glu).
15. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein natürlich auftretender Aminosäurerest ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der sauren Aminosäuren.
16. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist.
17. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.
18. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist, welcher ausgewählt ist aus der Gruppe der neutralen Aminosäuren.
19. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens einer der Aminosäurereste in den Positionen B27, B28 und B29 der B-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist.
20. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist.
21. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist.
22. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der B-Kette ein Asparaginsäurerest (Asp) ist.
23. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.
24. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.
25. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B29 der B-Kette ein Glutaminsäurerest (Glu) ist.
- 5

26. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz  
 $\text{phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr}$   
 aufweist (SEQU ID NO 3).
27. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B27 der I-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist.
28. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz  
 $\text{phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr}$   
 aufweist (SEQU ID NO 5).
29. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäurerest in Position B28 der I-Kette ein Isoleucinrest (Ile) ist.
30. Insulinderivat oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die B-Kette die Sequenz  
 $\text{phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr}$   
 aufweist (SEQU ID NO 4).

31. Verfahren zur Herstellung eines Insulinderivats oder eines physiologisch verträglichen Salzes desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 30, umfassend die Konstruktion eines replizierbaren Expressionsvehikels, welches eine DNA-Sequenz enthält, die für einen Vorläufer des Insulinderivats kodiert, in welchem der Aminosäurerest in Position A1 der A-Kette mit dem Aminosäurerest B30 der B-Kette über eine Peptidkette der Formel II
- R<sup>1</sup>-n-Arg-                    II
- verknüpft ist, worin R<sup>1</sup> eine Peptidkette mit n Aminosäureresten ist und n eine ganze Zahl von 0 bis 34 bedeutet, und die B-Kette an Position B1 mit einer Peptidkette der Formel III
- Met-R<sup>2</sup>-m-(Arg)<sub>p</sub>-                    III
32. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle ein Bakterium ist.
33. Verfahren nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß das Bakterium E. coli ist.
34. Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die Wirtszelle eine Hefe ist.
35. Verfahren nach Anspruch 34, dadurch gekennzeichnet, daß die Hefe Saccharomyces cerevisiae ist.
36. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35 zur Herstellung eines Insulinderivats gemäß Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des Insulinderivats die Sequenz

st Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg  
 e Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 r Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Glu Thr  
 3 Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gin Val Gly Gin Val Glu Leu Gly  
 r Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gin Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
 r Leu Gin Lys Arg  
 r Ile Val Glu Gin Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gin  
 u Glu Asn Tyr Cys Asn  
 iweist (SEQU ID NO 6).

Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35 zur Herstellung eines  
 ulinderivats gemäß Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des  
 ulinderivats die Sequenz  
 t Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg  
 e Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 r Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Ile Pro Lys Thr  
 l Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gin Val Gly Gin Val Glu Leu Gly  
 r Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gin Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
 r Leu Gin Lys Arg  
 r Ile Val Glu Gin Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gin  
 u Glu Asn Tyr Cys Asn  
 iweist (SEQU ID NO 8).

38. Verfahren nach einem der Ansprüche 31 bis 35 zur Herstellung eines Insulinderivats gemäß Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß der Vorläufer des Insulinderivats die Sequenz
- 5 Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg  
 Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu  
 Tyr Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Ile Lys Thr  
 Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro Gin Val Gly Gin Val Glu Leu Gly  
 Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu Gin Pro Leu Ala Leu Glu Gly  
 10 Ser Leu Gin Lys Arg  
 Gly Ile Val Glu Gin Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gin  
 Leu Glu Asn Tyr Cys Asn
- 15 aufweist (SEQU ID NO 7).
39. Vorläufer des Insulinderivats gemäß Anspruch 36.
40. Vorläufer des Insulinderivats gemäß Anspruch 37.
- 20 41. Vorläufer des Insulinderivats gemäß Anspruch 38.
42. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinderivats gemäß Anspruch 39 kodiert.
- 25 43. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinderivats gemäß Anspruch 40 kodiert.
- 30 44. DNA-Sequenz, welche für einen Vorläufer des Insulinderivats gemäß Anspruch 41 kodiert.
45. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 42.

6. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gem Anspruch 43.

7. Expressionsvehikel, enthaltend eine DNA-Sequenz gemäß Anspruch 44.

8. Wirtszelle, die mit einem Expressionsvehikel gemäß einem der Ansprüche 45 bis 47 transformiert ist.

9. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß sie mindestens ein Insulinderivat und/oder ein physiologisch verträgliches Salz desselben gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 30 enthält.

0. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, daß sie das Insulinderivat und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben in teilstärker, amorpher und/oder kristalliner Form enthält.

1. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, daß sie ferner einen Depothilfsstoff enthält.

2. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 51, dadurch gekennzeichnet, daß der Depothilfsstoff Protaminsulfat ist, wobei das Insulinderivat und/oder das physiologisch verträgliche Salz desselben mit dem Protaminsulfat in einem Kristallisat vorliegt.

3. Injizierbare Lösung mit Insulinaktivität, enthaltend die pharmazeutische Zubereitung gemäß einem der Ansprüche 49 bis 52 in gelöster Form.

4. Verwendung des Insulinderivats und/oder dessen physiologisch verträglichen Salzes gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 30 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung, welche eine Insulinaktivität mit schnellem Virkungseintritt aufweist.

SEQUENZPROTOKOLL

- (1) ALLGEMEINE INFORMATION:
- (i.) ANHEFTER:  
 (A) NAME: Hochst Marion Roussel Deutschland GmbH  
 (B) STRASSE: -  
 (C) ORT: Frankfurt am Main  
 (D) BUNDESLAND: -  
 (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland  
 (F) POSTLETTZIALE: 65926  
 (G) TELEFON: 069-305-3307  
 (H) TELEFAX: 069-35-7175
- (ii.) ANHEDETTTEL: Insulinderivate mit schnellem Wirkungseintritt
- (iii.) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8
- (iv.) COMPUTER-LESSEARIE FORM:  
 (A) DATENTRÄGER: Flüssig disk  
 (B) COMPUTER: IBM PC Compatible  
 (C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Version #1.25 (EPA)
- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:
- (i.) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii.) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (ix.) MERKMALE:  
 (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..21
- (xi.) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:  
 Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Asn  
 20
- (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:
- (i.) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii.) ART DES MOLEKÜLS: Protein
- (lx.) MERKMALE:  
 (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..30
- (xii.) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Phe Val Asn Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

## 2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (ix) MERkmale:  
 (A) NAME/Schlüssel: Protein  
 (B) LAGE: 1..30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

## 2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (ix) MERkmale:  
 (A) NAME/Schlüssel: Protein  
 (B) LAGE: 1..30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr  
 20 25 30

## 2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (ix) MERkmale:  
 (A) NAME/Schlüssel: Protein  
 (B) LAGE: 1..30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr  
 20 25 30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:  
 Phe Val Lys Gln His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 97 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (ix) MERkmale:  
 (A) NAME/Schlüssel: Protein  
 (B) LAGE: 1..97

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 20 25 30  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Gln Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Gln Val Glu Leu Gly Pro Gln Ala Gly Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Gln  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 97 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (ix) MERkmale:  
 (A) NAME/Schlüssel: Protein  
 (B) LAGE: 1..97

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Glu Ala . . . u Asp Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Gly Gin Val Glu Leu Gly Pro Gly Gly Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn

## 2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

## (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 97 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzel
- (D) TOPOLOGIE: linear

## (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

## (ix) MERkmale:

- (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..97

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 20 25 30  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr Arg Glu Ala Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Gly Gin Val Glu Leu Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn

## SEQUENZPROTOKOLL

## (1) ALLGEMEINE INFORMATION:

- (i) ANNELEIDER:  
 (A) NAME: Hoechst Marion Roussel Deutschland GmbH  
 (B) STRASSE: -  
 (C) ORT: Frankfurt am Main  
 (D) BUNDESLAND: -  
 (E) LAND: Bundesrepublik Deutschland  
 (F) POSTLEITZAHL: 65526  
 (G) TELEFON: 069-305-5307  
 (H) TELEFAX: 069-35-175

- (ii) ANNELEDETITEL: Insulinderivate mit schnellem Wirkungseintritt

## (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 8

- (iv) COMPUTER-LESBAR FORM:  
 (A) DATENTRÄGER: Floppy disk  
 (B) COMPUTER: IBM PC compatible  
 (C) BETRIEBSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS  
 (D) SOFTWARE: Patentin Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (iii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERkmale:

- (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..21

- (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..21

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

Gly Ile Val Glu Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu  
 1 5 10 15  
 Glu Asn Tyr Cys Asn  
 20 25

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

## (iii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

- (ix) MERkmale:
- (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein
  - (B) LAGE: 1..30

- (A) NAME / SCHLÜSSEL: Protein
  - (B) LAGE: 1..30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Phe Val Asn Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

- (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERkmale:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

- (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERkmale:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..30

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Ile Lys Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

- (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 30 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: Linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERkmale:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..30

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:  
 Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Val Cys Gly Glu Arg Gly Phe Tyr Thr Pro Lys Thr  
 20 25 30

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

- (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 97 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERkmale:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..97

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 20 25 30  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Pro Glu Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
 65 70 80  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

- (1) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:  
 (A) LÄNGE: 97 Aminosäuren  
 (B) ART: Aminosäure  
 (C) STRANGFORM: Einzel  
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERkmale:  
 (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein  
 (B) LAGE: 1..97

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Phe Val Lys Gin His Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 20 25 30

Arg Gly Phe Phe Tyr Thr Ile Lys Thr Arg Arg Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn

## (2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 97 Aminosäuren
  - (B) ART: Aminosäure
  - (C) STRANGFORM: Einzel
  - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(ix) MERKMALE:
 

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: Protein
- (B) LAGE: 1..97

## (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Ala Thr Thr Ser Thr Gly Asn Ser Ala Arg Phe Val Lys Gln His  
 1 5 10 15  
 Leu Cys Gly Ser His Leu Val Glu Ala Leu Tyr Leu Val Cys Gly Glu  
 20 25 30  
 Arg Gly Phe Phe Tyr Ile Pro Lys Thr Arg Arg Glu Ala Glu Asp Pro  
 35 40 45  
 Gln Val Gly Gln Val Glu Leu Gly Gly Pro Gly Ala Gly Ser Leu  
 50 55 60  
 Gln Pro Leu Ala Leu Glu Gly Ser Leu Gln Lys Arg Gly Ile Val Glu  
 65 70 75 80  
 Gln Cys Cys Thr Ser Ile Cys Ser Leu Tyr Gln Leu Glu Asn Tyr Cys  
 85 90 95  
 Asn

Hoechst Marioussel Deutschland GmbH HMR 97/L 200 Dr. MS/we

## Zusammenfassung

## 5 Neue Insulinderivate mit schnellem Wirkungseintritt

- (2) Die vorliegende Erfindung betrifft Insulinderivate, welche einen im Vergleich zu Humaninsulin beschleunigten Wirkungseintritt aufweisen, ein Verfahren zu deren Herstellung und deren Verwendung insbesondere in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Diabetes mellitus.

Im besonderen betrifft die vorliegende Erfindung Insulinderivate oder physiologisch verträgliche Salze derselben, in welchem Asparagin (Asn) in Position B3 der B-Kette durch einen natürlich auftretenden basischen Aminosäurerest ausgetauscht ist und wenigstens ein Aminosäurerest in den Positionen B27, B28 oder B29 der B-Kette durch einen anderen natürlich auftretenden Aminosäurerest ausgetauscht ist, wobei fakultativ Phenylalanin (Phe) in Position B1 der B-Kette fehlen kann.